هورمون درمانی: راه کاری موثر در تنظیم پاسخ سلول‌های Th1 زنان مبتلا به آسم آلرژیک

لیلا نجات بخش صمیمی: کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
مرتضی فلاح پور: استادیار و متخصص گروه آلرژی و ایمونولوژی بالینی، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
مجید خوش میرصفا: دانشجوی دکترای تخصصی ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
رسول بهارلو: دکترای تخصصی ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
پریا جربزه دار: دانشجوی دکترای تخصصی ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
سید علی جواد موسوی: استاد و متخصص داخلی، فوق تخصص ریه، مرکز تحقیقات آلودگی هوا، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
* **رضا فلک**: دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). falak.r@iums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: الگوی بروز آسم در سنین مختلف متفاوت بوده و شیوع آن در زنان بیشتر از مردان می‌باشد. باتوجه به اینکه در اغلب موارد علائم آسم قبل از قاعدگی تشدید شده و در دوره بارداری دچار تغییراتی می‌شود لذا به نظر می‌رسد که نوسانات هورمون‌های جنسی می‌تواند روی آن موثر باشند. از طرفی هورمون‌تراپی یکی از درمان‌های رایج و پذیرفته شده طی دوران یائسگی و کنترل برخی از بیماری‌ها می‌باشد. در این مطالعه اثر هورمون‌های جنسی استروژن و پروژسترون بر بیان فاکتور رونویسی T-bet و سایتوکاین IFN-γ (به عنوان مشخصه پاسخ های Th1) در سلول های تک هسته ای خون محیطی زنان یائسه مبتلا به آسم آلرژیک با گروه سالم مقایسه شد.

روش کار: در این مطالعه شاهدی موردی تعداد ۱۳ خانم یائسه مبتلا به آسم آلرژیک و ۱۳ کنترل سالم با سن مشابه وارد مطالعه شدند. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در حضور غلظت معادل با سطح سرمی هورمون‌های استرادیول (10^{-8} مولار) و پروژسترون (10^{-6} مولار) در طی هرمون‌تراپی، به صورت جداگانه و یا ترکیبی کشت داده شدند. سپس میزان ترشح سایتوکاین IFN-γ در مایع رویی کشت سلولی با روش الایزا سنجیده شد و میزان بیان فاکتور رونویسی T-bet توسط Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: هورمون‌های استرادیول و پروژسترون به تنهایی تغییر چندانی در بیان ژن T-bet و نیز سطح سایتوکاین IFN-γ ایجاد نکردند، اما اثر ترکیبی این دو هورمون منجر به افزایش معنادار بیان این ژن و سایتوکاین مرتبط با سلول‌های Th1 در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل گردید که میانه و دامنه بین چارکی به ترتیب ۸۴/۰۴ (۳۲-۷۷/۱۷۷) در مقابل ۷۱/۵۲(۸۵/۰۴-۶۸/۸۴) پیکوگرم در میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: افزایش سطح سایتوکاین IFN-γ به تاثیر مثبت هورمون‌تراپی و حفظ تعادل سایتوکاینی در این شرایط اشاره می‌نماید. با این حال با توجه به نقش موثر سلول‌های دیگر از جمله $CD8^+$ T در بیماری آسم و امکان ترشح سایتوکاین IFN-γ از این سلول‌ها، نیاز به مطالعات بیشتری جهت شفاف سازی اثر این هورمون‌ها به ویژه بر روی زیرگروه‌های مختلف سلول‌های $CD4^+$T و نیز سلول‌های $CD8^+$T در بیماران مبتلا به آسم آلرژیک وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: آسم آلرژیک، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، هورمون درمانی، استرادیول، پروژسترون

مقدمه

آسم به بیماری التهابی مزمنی اطلاق می‌گردد که با علائم پاتولوژیکی چون انقباض برگشت‌پذیر برونش‌ها، افزایش ترشح موکوس، افزایش غلظت ترشحات مخاطی، و افزایش ضخامت مجاری هوایی به دلیل هیپرپلازی و هیپرتروفی سلول‌های عضله‌ی صاف مجاری بروز می‌یابد. بیماران مختلف این علائم را با شدت‌های متفاوتی تجربه می‌کنند که از بسیار خفیف تا انسداد کامل مجاری هوایی و مرگ ناشی از آن متغیر می‌باشد. به دلیل این رخدادها فرد دچار تنگی نفس، گرفتگی و خس خس سینه، سرفه و کاهش ظرفیت قلبی-تنفسی می‌گردد (۱، ۲).

این بیماری می‌تواند طیف سنی وسیعی را درگیر سازد که از نوزادان تا افراد کهنسال را در برمی‌گیرد. عوامل ژنتیکی و محیطی گوناگونی در بروز این بیماری دخیل هستند و مطالعات انجام شده در این زمینه، ژن‌های متعددی را در افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

استعداد ابتلا به این بیماری معرفی نموده اند (۳). سلول‌های T CD4+ نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و التهابی ایفا می‌کنند. این سلول‌ها پس از مواجهه با آنتی‌ژن اختصاصی عرضه شده به واسطه‌ی سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن، فعال شده و دچار گسترش کلونال می‌شوند و به زیر گروه‌های مختلفی نظیر سلول T کمکی ۱ (Th1) ، Th2، Th-17، Th9 و Treg تمایز می یابند. شیوع آسم در زنان بیشتر از مردان بوده و شواهد نشان می‌دهد که هورمون‌های جنسی (استروژن و پروژسترون) می‌توانند بر عملکرد ریه‌ها اثر داشته باشند. الگوهای متفاوت بروز بیماری در دو جنس زن و مرد و نیز وجود پذیرنده‌های هورمون‌های جنسی زنانه بر روی سلول‌های سیستم ایمنی ازجمله ائوزینوفیل‌ها، سلول‌های دندریتیک و سلول‌های T و B می‌توانند نشان دهنده‌ی ارتباط هورمون‌های جنسی با بیماری آسم باشند (۴).

نتایج مطالعاتی که طی سال های اخیر با هدف بررسی سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی نظیر IL-6 ، TNF-α و IL-1β و سایتوکاین‌های ضد التهابی نظیر IL-10، TGF-β پس از درمان های هورمونی انجام گرفته است با پاسخ‌های ضد و نقیضی همراه می‌باشد که گاه به نقش هورمون‌های جنسی استروژن و پروژسترون در تشدید شرایط التهابی اشاره می‌کنند و گاه به بررسی اثر ضد التهابی این هورمون‌ها می‌پردازند. حدود ۵۲-۳۳ درصد از زنان مبتلا به آسم، تشدید علائم بیماری را طی فاز پیش از قاعدگی (Premenstrual worsening) گزارش نموده‌اند، در حالی که ۲۲ درصد بیماران از تشدید علائم طی سیکل قاعدگی شکایت داشته‌اند (۵-۹)، و مطالعات نشان می‌دهد که این زنان بیشترین میزان مراجعه به پزشک و بستری در بیمارستان را به علت تشدید علائم تجربه کرده اند (۵). تقریباً ۵۰ درصد زنانی که به علت آسم در بیمارستان بستری شده اند در فاز پیش از قاعدگی قرار داشته اند (۶). هنوز ارتباط میان هورمون‌های جنسی در شرایط بارداری و علائم آسم کاملاً مشخص نشده است. اگرچه در اکثر زنان باردار، آسم در شرایط کنترل شده‌ای قرار دارد، اما مطالعات نشان می‌دهد که تنها ۱۰ درصد از زنان بارداری که ابتلای آن ها به آسم، قبل از بارداری تشخیص داده شده است، تشدید علائم آسم حاد را بروز می‌دهند، در حالی که علائم آسم در ۳۰ درصد از زنانی که در سه ماهه‌ی آخر بارداری قرار دارند، بهتر می‌شود (۷). بر اساس نتایج تعداد زیادی از مطالعات، در فاز پیش از قاعدگی به علت افت سطح سرمی هورمون‌ها، علائم آسم تشدید می‌شود و اگزوژنوس هورمون‌تراپی در کاهش نوسانات هورمونی و جلوگیری از تشدید علائم آسم طی فاز پیش از قاعدگی نقش موثری داشته و منجر به کاهش وابستگی این بیماران به درمان های کورتیکوستروئیدی می‌شود (۱۲-۸).

هورمون‌تراپی به درمان ترکیبی شامل استروژن طبیعی یا سنتتیک به همراه پروژسترون سنتتیک یا پروژستین‌ها اطلاق می‌گردد. از اهداف انجام هورمون‌تراپی می‌توان به رفع علائم یائسگی، جلوگیری یا درمان استئوپروز پس از یائسگی (۱۳, ۱۴)، کاهش علائم برخی از بیماری‌های اتوایمیون (۱۱) و درمان آکنه (۱۵) اشاره کرد. تاکنون تحقیق جامعی که به طور مستقیم اثر هورمون‌های جنسی زنانه را بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به آسم مورد بررسی قرار دهد انجام نگرفته است و بر اساس عملکرد پذیرنده‌های این هورمون‌ها و نیز شناختی که از سایتوکاین‌های سیستم ایمنی به دست آمده فرضیات ضد و نقیضی در مورد عملکرد زیرگروه‌های سلول‌های T در بیماری آسم مطرح شده است که گاه آن ها را حفاظت کننده و گاه مخرب جلوه داده‌اند (۱۶). هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن T-bet و ترشح سایتوکاین IFN-γ از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به آسم آلرژیک و مقایسه آن با گروه کنترل سالم می‌باشد.

روش کار

ابتلا به آسم آلرژیک در ۱۳ بیمار خانم با میانگین سنی ۳/۰۲±۵۴/۹ و محدوده سنی ۶۰-۵۰ سال که در شرایط پس از یائسگی قرار داشتند

Archive of SID
www.SID.ir

توسط پزشک متخصص (بر اساس یافته‌های از قبیل شرح‌حال بیمار، آزمون‌های تشخیص IgE اختصاصی آلرژن)، تائید شد و ۱۳ خانم یائسه سالم نیز با میانگین سنی ۲/۸±۵۳/۸ به عنوان گروه کنترل سالم وارد این مطالعه موردی شاهدی شدند. ابتلا به عفونت در قسمت فوقانی مجاری هوایی، بیماری‌های اتوایمیون، متابولیک و نیز مصرف داروهای هورمونی از موارد خروج از مطالعه بود. پس از کسب رضایت افراد (کد اخلاق: IR.IUMS.REC 1395. 9311127007)، حدود ۱۰ میلی‌لیتر خون همراه با ضد انعقاد EDTA گرفته شد.

کشت سلول: پس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral -PBMC Blood Mononuclear Cells) توسط گرادیان فایکول (۱۷)، غلظت سلول بر میلی لیتر 10^{-6} در حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت (Gibco, RPMI-1640, %1 Pen/Strep, 10%FBS UK) در چاهک‌ها ریخته شد و طبق ۸ حالت: ۱) کنترل منفی [فاقد تیمار هورمونی و فیتوهمگالوتینین (PHA)]، ۲) کنترل مثبت (PHA 1% Gibco, UK)، ۳) استرادیول با غلظت 10^{-8} مول بر لیتر (E2758, Sigma, Germany)، ۴) استرادیول و PHA، ۵) پروژسترون با غلظت 10^{-6} مول بر لیتر (P8783, Sigma, Germany) ، ۶) پروژسترون و PHA، ۷) ترکیب هورمون‌های استرادیول و پروژسترون با غلظت‌های مذکور، ۸) ترکیب هورمون‌های استرادیول و پروژسترون با غلظت‌های مذکور به همراه PHA. دوزهای 10^{-8}مول بر لیتر برای هورمون استرادیول و 10^{-6}مول بر لیتر برای هورمون پروژسترون (با توجه به این که این غلظت ها معادل سطح سرمی هورمون‌های استرادیول و پروژسترون در زنان مصرف کننده‌ی COCs بود) انتخاب گردید (۱۸, ۱۹). در نهایت، انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در حضور 5% CO_2 انجام گرفت.

استخراج Total RNA از سلول‌های PBMC و سنتز cDNA : پس از برداشت مایع رویی کشت سلولی و فریز نمودن آن در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد جهت بررسی سطح سایتوکاین IFN-γ با تست الایزا، استخراج RNA از رسوب سلولی با روش فنل-کلروفرم و بر اساس پروتکل (QiagenRNeasy, Qiagen, USA) انجام گرفت و غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد و خلوص آن از طریق الکتروفورز ژل ۱٪ با اوره ۴ مولار تایید گردید. سنتز cDNA بر اساس پروتکل کیت (Takara, USA) انجام گرفت که برای این منظور از ۰/۹ میکروگرم RNA استفاده گردید.

واکنش Real-Time PCR: cDNA طبق پروتکل کیت Takara با پروفایل دمایی (۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و خاتمه واکنش در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه) سنتز شده با استفاده از روش سایبرگرین و طبق پروتکل دمایی مسترمیکس کمپانی (Biofact, South Korea) توسط دستگاه-Rotor Gene Q (QIAGEN) تکثیر شد. توالی پرایمرها برای ژن های GAPDH و T-bet در جدول ۱، نمایش داده شده است.

سنجش سایتوکاین IFN-γ توسط تست الایزا: میزان ترشح سایتوکاین IFN-γ در مایع رویی کشت سلولی بر اساس پروتکل کیت (BD, USA) تعیین گردید. حجم لازم از آنتی بادی پوشاننده (Coating Ab) در چاهک‌های پلیت الایزا ریخته شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در ادامه پس از شستوشو بلاکینگ انجام گرفت و در مراحل بعدی پس از افزودن نمونه و استانداردها، آنتی‌بادی شناسایی‌کننده بیوتینیله و کونژوگه استرپتاویدین-HRP (Horse radish peroxidase) به چاهک‌ها

جدول ۱- پرایمرهای مربوط به ژن‌های GAPDH و T-bet

ژن	پرایمر Forward	پرایمر Reverse
GAPDH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC -3'	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA -3′
T-bet	5'-GAT GTT TGT GGA CGT GGT CTT -3′	5'-CTT TCC ACA CTG CAC CCA CTT -3′

Archive of SID
www.SID.ir

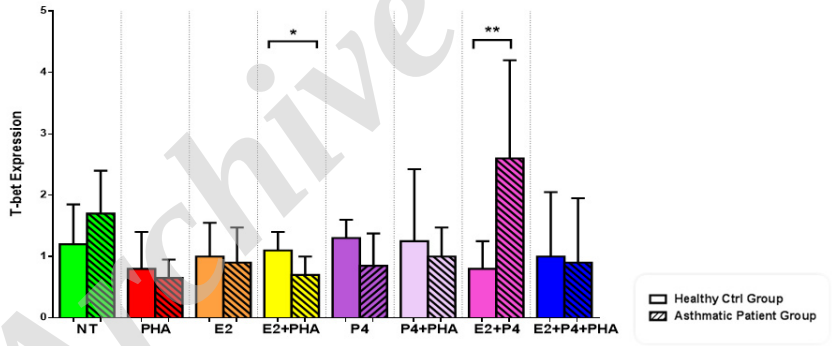
افزوده شد. در نهایت محلول سوبسترای TMB و اسید سولفوریک اضافه گشت و واکنش آنزیمی متوقف گردید. باتوجه به سطح بالای تولید سایتوکاین IFN-γ توسط سلول‌های PBMC در پاسخ به تحریک PHA و هورمون‌ها، مایع رویی کشت سلولی قبل از اندازه‌گیری این سایتوکاین در نمونه‌های بیماران و گروه کنترل که حاوی PHA بودند به نسبت ۱:۲۰ و در نمونه‌های فاقد PHA به نسبت ۱:۱۰ رقیق گردید.

آنالیز آماری: برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها (Normal distribution) از آزمون آماری شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk) و دی آگوستینو (D'Agostino) استفاده شد. با توجه به نتیجه این آزمون‌ها از تست‌های غیر پارامتریک من‌ویتنی (Mann–Whitney U test) برای مقایسه میان دو گروه و کروسکال والیس (Kruskal-Wallis) برای مقایسه‌ی بیش از دو گروه به منظور تحلیل آماری استفاده گردید.

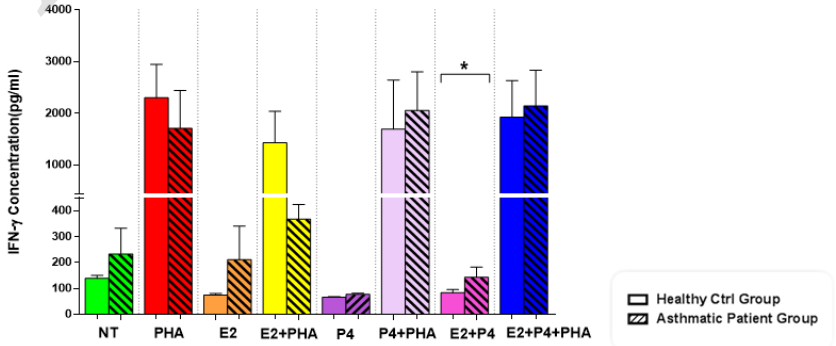
برای محاسبه نتایج بیان ژن از روش مقایسه بیان نسبی (Relative expression) و با فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد؛ بدین منظور از ژن مرجع GAPDH برای نرمال‌سازی بیان ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد، همچنین با استفاده از هفت رقت تهیه شده از محصول واکنش PCR (از رقت 10^{-4} تا 10^{-10}) و رسم منحنی استاندارد، میزان کارایی (Efficiency) واکنش PCR برای هر ژن سنجیده شد و با توجه به یکسان بودن مقدار کارایی واکنش (R^2=0.99) در ژن های مورد مطالعه از مدل لیواک (Livak) در فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ برای محاسبه نتایج استفاده گردید.

یافته‌ها

همانطور که شکل ۱ نشان می دهد، بیان ژن T-bet در سلول‌های PBMC گروه بیمار که هیچ گونه مداخله درمانی بر روی آن‌ها صورت نگرفته بود نسبت به گروه کنترل اندکی افزایش نشان داد،



شکل ۱- نمودار مقایسه میزان بیان ژن T-bet میان گروه‌های کنترل و بیمار. بیان ژن T-bet پس از تیمار سلول‌های PBMC با هورمون استرادیول در حضور PHA و همچنین پس از تیمار سلول‌ها با ترکیب هورمون‌های استرادیول و پروژسترون به صورت معناداری در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل سالم افزایش یافت.



شکل ۲- نمودار مقایسه سطح سایتوکاین IFN-γ میان گروه‌های کنترل و بیمار. ترشح سایتوکاین IFN-γ پس از تیمار سلول‌های PBMC با ترکیب هورمون‌های استرادیول و پروژسترون در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل سالم به صورت معناداری افزایش یافت.

Archive of SID
www.SID.ir

کـه ایـن افـزایش معنـادار نبـود. پـس از تیمـار PBMCs با PHA در گروه بیمار، بیـان ژن T-bet نسبت به گـروه کنتـرل بـه میـزان بسـیار انـدکی کـاهش یافـت. بیـان ژن T-bet در سـلول‌های PBMC گروه بیمار که بـا هورمـون اسـترادیول بـا غلظت 10^{-8} مولار تیمار شده بودند نسبت به گـروه کنترل نیز به میزان بسیار اندکی کاهش یافت. پس از تیمار PBMC، بیان ژن T-bet در گـروه بیمـار که با E2+PHA تیمار شده بودند نسبت بـه گـروه کنترل کاهش یافت که ایـن کـاهش معنـادار بـود (p=۰/۰۳۲۲). بیـان ژن T-bet در سـلول‌های PBMC گروه بیمار که با هورمـون پروژسـترون بـا غلظت 10^{-6}مولار تیمار شده بودند نسبت به گـروه کنترل کاهش یافت، همچنـین بیـان ژن T-bet در سلول‌های PBMC گروه بیمـار کـه بـا P4+PHA تیمار شده بودند نسـبت بـه گـروه کنتـرل انـدکی کاهش یافت، که این کاهش ها معنادار نبود. بیـان ژن T-bet در سلول‌های PBMC گروه بیمار که بـا ترکیـب هورمون‌هـای اسـترادیول (10^{-8} مـولار) و پروژسترون (10^{-6}مولار) تیمار شده بودند نسب بـه گروه کنترل افزایش یافت که این افـزایش معنـادار بود (p=۰/۰۰۴۹). پس از تیمار سلول‌های PBMC با E2+P4+PHA، بیان ژن T-bet در گـروه بیمـار نسبت به گـروه کنتـرل بـه میـزان بسـیار انـدکی کاهش یافت، که این کاهش معنادار نبود.

همانطور کـه شـکل ۲ نشـان مـی دهـد، سـطح سایتوکاین IFN-γ در مایع رویی کشت سلول‌های PBMC گروه بیمار که هـیچ مداخلـه درمـانی بـر روی آن ها صـورت نگرفتـه بـود نسـبت بـه گـروه کنترل کاهش نشان داد. پس از تیمار PBMCs بـا PHA سطح IFN-γ در مـایع رویـی کشـت گـروه بیمار نسبت به گروه کنترل کاهش یافت کـه ایـن کاهش نیز معنـادار نبـود. سـطح IFN-γ در مـایع رویی کشت سلول‌های PBMC گروه بیمار کـه بـا هورمون استرادیول با غلظت 10^{-8}مولار تیمار شده بودند نسبت به گروه کنترل افزایش یافت، که ایـن افـزایش معنـادار نبـود. در مـایع رویـی کشـت سلول‌های PBMC گروه بیمـار کـه بـا E2+PHA تیمار شده بودند، سـطح IFN-γ نسـبت بـه گـروه کنترل کاهش یافت که این کـاهش معنـادار نبـود. سـطح IFN-γ در مـایع رویـی کشـت سـلول‌های PBMC گروه بیمار که با هورمـون پروژسـترون بـا غلظت 10^{-6}مولار تیمار شده بودند نسبت به گـروه کنترل به میزان بسیار اندکی افزایش یافت. سـطح IFN-γ در مایع رویـی کشـت سـلول‌های PBMC گروه بیمـار کـه بـا P4+PHA تیمـار شـده بودنـد نسبت به گروه کنترل نیز افزایش داشـت کـه ایـن افـزایش معنـادار نبـود. در مـایع رویـی کشـت سـلول‌های PBMC گـروه بیمـار کـه بـا ترکیـب هورمون‌های استرادیول (10^{-8}مولار) و پروژسترون (10^{-6} مولار) تیمار شده بودند، سطح IFN-γ نسب به گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافت (p= ۰/۰۴۹۷). سـطح IFN-γ در مـایع رویـی کشـت سـلول‌های PBMC گـروه بیمـار کـه بـا E2+P4+PHA تیمار شده بودند نسـبت بـه گـروه کنترل کاهش داشت که این کاهش معنـادار نبـود. مقایسه نتایج میان گروه‌هـای کنتـرل و بیمـار بـه صـورت میانـه و دامنـه بـین چـارکی IQR

جدول ۱- میانه (دامنه بین چارکی) برای سایتوکاین IFN-γ در مایع رویی کشت سلول‌های PBMC. سطح ترشح IFN-γ به صورت معناداری تنها در گروهی کـه بـا ترکیب هورمون‌های استرادیول و پروژسترون تیمار شده بود، افزایش یافت.

	گروه‌ها	میانه (دامنه بین چارکی) (گروه کنترل سالم)	میانه (دامنه بین چارکی) (گروه بیماران آسم آلرژیک)	p
سایتوکاین IFN-γ (پیکوگرم بر میلی لیتر)	No-Treatment	139.1 (19.5-162.6)	89.98 (68.18-151.7)	غیر معنادار
	PHA	1876 (847.7-3704)	582 (323.5-3336)	غیر معنادار
	E2	64.08 (61.62-90.87)	76.48 (63.25-109)	غیر معنادار
	E2 + PHA	952.6 (301.9-1709)	373.2 (278.1-490.6)	غیر معنادار
	P4	68.18 (58.38-69.83)	69.83 (67.77-82.43)	غیر معنادار
	P4 + PHA	260.2 (207.5-2595)	410.7 (262.5-3877)	غیر معنادار
	E2 + P4	71.52 (62.85-84.04)	84.04 (77.32-177)	معنادار (*)
	E2 + P4 + PHA	1245 (246.1-4039)	325.3 (214.4-4389)	غیر معنادار

Archive of SID
www.SID.ir

(Interquartile range) در جدول ۲ نمایش داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده شد که پس از هورمون‌تراپی سطح سایتوکاین IFN-γ و بیان ژن T-bet افزایش می‌یابد و می‌تواند در حفظ تعادل سایتوکانی بیماران مبتلا به آسم آلرژیک موثر باشد. با توجه به نقش مهم سلول‌های Th1 در حفظ تعادل پاسخ های مرتبط با سلول‌های Th2 و نیز ارتباط هورمون‌های جنسی استروژن و پروژسترون در تنظیم پاسخ‌های سیستم ایمنی، این گونه به نظر می‌رسد که الگوی پاسخ‌های مرتبط با زیرگروه سلولی Th1 (بیان فاکتور رونویسی T-bet و تولید سایتوکاین IFN-γ) از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در زنان مبتلا به آسم آلرژیک تحت تاثیر دوز متفاوت هورمون‌های جنسی استروژن و پروژسترون قرار می‌گیرد. در مطالعات قبلی نشان داده شده بود که بیان فاکتور رونویسی T-bet به عنوان یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی زیر گروه Th1 در بیماران مبتلا به آسم آلرژیک پس از تحریک سلول‌های PBMC کاهش می‌یابد. در مطالعه حاضر نیز یافته‌های به دست آمده از تحریک سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با PHA در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل این موضوع را تایید نمود. همچنین بیان فاکتور رونویسی T-bet در گروه بیمار پس از تحریک سلول‌ها با PHA نسبت به حالت تحریک نشده کاهش یافت که این کاهش نیز معنادار بود (نتایج نشان داده نشده است). در گروه کنترل تغییرات قابل توجهی پس از تیمار سلول‌ها با هورمون‌های استرادیول و پروژسترون مشاهده نگردید، اما در گروه بیماران مبتلا به آسم آلرژیک تیمار سلول‌ها با استرادیول و پروژسترون (به صورت جداگانه) به طور معناداری منجر به کاهش بیان فاکتور رونویسی T-bet گردید (نتایج نشان داده نشده است).

نتایج مطالعات انجام شده در مدل‌های موشی نشان می‌دهد که تحریک اسپلنوسیت‌ها با کانکاوالین A و یا استفاده از آنتی‌بادی علیه CD3 به همراه تیمار هورمونی با استرادیول منجر به افزایش بیان فاکتور رونویسی T-bet و نیز افزایش ترشح سایتوکاین IFN-γ می‌گردد که البته این موضوع در مورد سلول‌هایCD4+T تخلیص شده نیز صدق می‌کند و پاسخ ها را به سمت زیرگروه سلول‌های Th1 شیفت می‌دهد (۲۰)، در حالی که نتایج مطالعات انسانی نشان می‌دهد که تحریک سلول‌ها با هورمون پروژسترون در دوزهای بارداری منجر به مهار تمایز سلول‌های زیرگروه Th1 شده و پاسخ‌ها را به سمت زیرگروه Th2 نظیر تولید IL-10 شیفت می‌دهد. پروتئین PIBF (Progesterone induced blocking factor) که تحت تاثیر پروژسترون در لنفوسیت‌های T تولید می‌شود، بیان فاکتور رونویسی STAT-4 را مهار نموده و از این طریق بیان فاکتور T-bet را کاهش می‌دهد (۲۱, ۲۲)، که این مطالب در کل به وجود تفاوت نتایج در مدل‌های موشی و انسانی اشاره می نماید. در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی بیان T-bet پس از تیمار با هورمون‌های استرادیول و پروژسترون به صورت جداگانه در گروه بیمار با نتایج به دست آمده از مطالعات انسانی همسو بود، اما در مقایسه‌ی نتایج میان دو گروه مورد مطالعه، با وجود کاهش بیان T-bet در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل پس از تحریک سلول‌ها با استرادیول و پروژسترون به صورت جداگانه (عدم تحریک با PHA) ، این کاهش معنادار نبود. با این حال تحریک سلول‌ها با مجموعه E2+PHA منجر به کاهش معناداری در بیان فاکتور رونویسی T-bet نسبت به گروه کنترل گردید.

نکته‌ی جالب توجهی که می‌توان به آن اشاره نمود این است که با وجود اثرات مهاری هورمون‌های استرادیول و پروژسترون به صورت جداگانه بر بیان فاکتور رونویسی T-bet، پس از تیمار سلول‌ها با ترکیب استرادیول و پروژسترون بیان فاکتور T-bet در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافت که با وجود کمبود مطالعات انجام گرفته بر اثر ترکیبی این دو هورمون، می‌توان به تاثیر متفاوت این هورمون‌ها به صورت جداگانه و یا به صورت ترکیبی اشاره نموده و به این صورت نتیجه گرفت که تیمار

Archive of SID
www.SID.ir

جداگانه سلول‌ها با هورمون‌های استرادیول و پروژسترون منجر به هدایت پاسخ‌ها به سمت زیرگروه سلول‌های Th2 در بیماران مبتلا به آسم آلرژیک می‌شود، در حالی که استفاده از ترکیب این دو هورمون بیان T-bet را افزایش داده و موجب شیفت پاسخ‌ها به سمت زیرگروه سلول‌های Th1 و ایجاد تعادل میان دو زیرگروه Th1 و Th2 می‌شود که این مساله به نفع بهبود علائم آسم می‌باشد.

در این مطالعه سطح سایتوکاین IFN-γ (سایتوکاین شاخص زیرگروه Th1) در گروه بیمار پیش از هرگونه مداخله درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش داشت که این موضوع بیانگر نقش غالب زیرگروه سلول‌های Th2 در بیماری آسم آلرژیک می‌باشد (۲۳). همچنین سطح سایتوکاین IFN-γ پس از تحریک سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با PHA در هر دو گروه کنترل و بیمار به صورت معناداری افزایش یافت (سطح IFN-γ در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل نیز پس از تحریک سلولی افزایش پیدا کرد). در سال ۲۰۱۰ نتایج مطالعات نشان داد که استرادیول در غلظت‌های پایین (غلظت‌های کمتر از 10^{-8} مولار) موجب افزایش ترشح سایتوکاین‌های التهابی TNF-α، IL-1β ونیز سایتوکاین IFN-γ از سلول‌های PBMCs تحریک شده توسط PHA-L و یا LPS می‌شود، برخلاف این مطلب، استرادیول در غلظت‌های بالا (غلظت‌های بیشتر از 10^{-6} مولار) سنتز سایتوکاین‌های التهابی TNF-α و IL-1β را مهار نموده و موجب افزایش سطح سایتوکاین‌های ضد التهابی IL-10 و IL1RA می‌شود. هورمون استرادیول در دوز های بالا عملکرد سلول‌های Treg را نیز افزایش می‌دهد (۱۸). در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل سطح IFN-γ پس از تیمار سلول‌ها با هورمون استرادیول افزایش یافت. مطالعه ای که بر روی اسپلنوسیت های جدا شده از طحال موش انجام شده بود نشان داد که تیمار این سلول‌ها با دوز های پایین استرادیول موجب تحریک پاسخ‌های Th1 شده، در حالی که دوز های بالای استرادیول هدایت پاسخ ها به سمت زیرگروه سلول‌های Th2 را سبب می‌شود، همچنین سطح سایتوکاین IFN-γ پس از تیمار سلول‌های Th1 با هورمون استرادیول افزایش می‌یابد (۲۴). اثر ترکیبی هر دو هورمون در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل نیز منجر به افزایش معنادار در سطح IFN-γ شد که این مطالب نشان دهنده ی اثر مثبت هورمون‌تراپی در هدایت پاسخ ها به سمت زیرگروه سلول‌های Th1 می‌باشد، هرچند که در تایید این مساله به مطالعات بیشتری نیاز بوده و لازم است که سلول‌های $CD4^+$ T تخلیص شوند و به زیرگروه‌های سلول T تمایز یابند و اثر غلظت‌های مختلف این دو هورمون بر این زیرگروه‌ها مورد بررسی قرار گیرد. نتایج برخی از مطالعات نشان می‌دهد که لنفوسیت‌ها در حضور پروژسترون با غلظت‌های بارداری، پروتئینی به نام PIBF تولید می‌کنند. ترشح سایتوکاین‌های IL-4، IL-13 و IL-10 در کشت لنفوسیت‌های T جدا شده از طحال موش‌های Balbc به همراه کانکاوالین A و پروتئین PIBF به طور چشمگیری افزایش یافت، اما تغییری در سطح سایتوکاین IFN-γ مشاهده نگردید (افزایش سطح سایتوکاین‌های IL-4، IL-13 و IL-10 در حضور PIBF مربوط به هر دو جمعیت سلول‌های CD4+T و CD8+T می‌باشد) (۲۵). در مورد نقش هورمون‌های جنسی نظیر استرادیول در بیماری‌های اتوایمیون نیز مطالعات زیادی انجام گرفته است. به عنوان مثال نتایج یکی از مطالعات که بر روی بیماران مبتلا به MS انجام گرفته بود، نشان داد که تحریک با هورمون استرادیول در غلظت‌های مشابه با بارداری، موجب افزایش ترشح IL-10 و IFN-γ از سلول‌های CD4+T اختصاصی برای نورو آنتی‌ژن‌های جدا شده از گروه کنترل و بیماران مبتلا به MS می‌شود (۲۶).

در این مطالعه با توجه به محدودیت‌های مالی امکان جداسازی سلول‌های $CD4^+$ T از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و کشت این سلول‌ها در محیط سایتوکاینی مناسب جهت تمایز به زیرگروه سلول‌های Th1 و بررسی اثر هورمون‌های استروژن و پروژسترون بر این سلول‌ها وجود نداشت. همچنین بخاطر محدودیت های زمانی

Archive of SID
www.SID.ir

امکان بررسی اثر دوزهای متفاوت هورمون‌های استروژن و پروژسترون بر بیان فاکتور رونویسی T-bet و تولید سایتوکاین IFN-γ از سلول‌های PBMC حاصل نشد. همگن سازی بیماران بر اساس نوع و شدت آلرژی و علائم آسم از نقاط قوت این مطالعه بود.

به طور کل می‌توان نتیجه گرفت که افزایش سطوح سایتوکاین IFN-γ و افزایش بیان ژن T-bet به تاثیر مثبت هورمون تراپی بر حفظ تعادل سایتوکانی در این بیماری اشاره می‌نماید، با وجود تعداد زیادی از مطالعات انجام شده، هنوز نقش سلول‌های Th1 در بیماری آسم آلرژیک کاملاً مشخص نیست. تعداد زیادی از مطالعات به نقش سلول‌های Th1 در جلوگیری از پیشرفت التهابات آلرژیک اشاره می‌کنند، اما برخی مقالات نیز به نقش مخرب زیرگروه Th1 در تشدید التهابات آلرژیک می‌پردازند. افزایش سطح سایتوکاین IFN-γ، الزاماً با افزایش پاسخ‌های Th1 مرتبط نمی‌باشد زیرا در بیماران مبتلا به آسم آتوپیک و غیر آتوپیک، جمعیت سلول‌های $CD8^+$ T که IFN-γ تولید می‌کنند نیز افزایش می‌یابد. افزایش سطح IFN-γ در بیماران مبتلا به آسم آلرژیک با افزایش ظرفیت سلول‌های $CD8^+$ T در تولید سایتوکاین IFN-γ مرتبط می‌باشد و جمعیت این سلول‌ها با شدت بیماری، افزایش واکنش پذیری برونش‌ها و ائوزینوفیلی ارتباط دارد. برخی مطالعات نیز به افزایش سطح IFN-γ در بیماران مبتلا به آسم که بیماری آن ها کنترل نشده است، اشاره می‌نمایند (۲۷).

تقدیر و تشکر

منابع مالی این پروژه از طرح تحقیقاتی شماره مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران تامین گردیده است.

منابع

1.Globe G, Martin M, Schatz M, Wiklund I, Lin J, von Maltzahn R, et al. Symptoms and markers of symptom severity in asthma--content validity of the asthma symptom diary. HQLO; 2015.13:21.

2.Elliot JG, Jones RL, Abramson MJ ,Green FH, Mauad T, McKay KO, et al. Distribution of airway smooth muscle remodelling in asthma: relation to airway inflammation. Respirology; 2015.20(1):66-72.

3.Martinez FD. Genes, environments, development and asthma: a reappraisal. ERJ; 2007. 29(1):179-84.

4.Sathish V, Martin YN, Prakash Y. Sex steroid signaling: Implications for lung diseases. Pharmacol Therap; 2015.150:94-108.

5.Eliasson O, Scherzer HH, DeGraff AC. Morbidity in asthma in relation to the menstrual cycle. Jacobs; 1986.77(1):87-94.

6.Skobeloff EM, Spivey WH, Silverman R, Eskin BA, Harchelroad F, Alessi TV. The effect of the menstrual cycle on asthma presentations in the emergency department. Arch Int Med; 1996.156(16):1837-40.

7.Guy ES, Kirumaki A, Hanania NA. Acute asthma in pregnancy. Crit Care Clin; 2004.20(4):731-45.

8.Beynon H, Garbett N, Barnes P. Severe premenstrual exacerbations of asthma: effect of intramuscular progesterone. The Lancet; 1988.332(8607):370-2.

9.Myers JR, Sherman CB. Should supplemental estrogens be used as steroid-sparing agents in asthmatic women? Chest; 1994.106(1):318-9.

10.Gotthardt M, Clark J, Roy T. Ovarian asthma-act or fancy? J Ky Med Assoc; 1996.94(3):105-8.

11.Haggerty CL, Ness RB, Kelsey S, Waterer GW. The impact of estrogen and progesterone on asthma. Ann Allerg Asthm Immunol; 2003. 90(3):284-91.

12.Pereira-Vega A, Sánchez JL, Gil FL, Maldonado JA, Bravo JM, Ignacio JM, et al. Premenstrual asthma and symptoms related to premenstrual syndrome. J Asthma; 2010.47(8):835-40.

13.Prieto GA, Rosenstein Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells by promoting their proliferation. Immunology; 2006.118(1):58-65.

14.Gambacciani M, Levancini M. Hormone replacement therapy and the prevention of postmenopausal osteoporosis. Przeglad menopauzalny= Menopaus Rev. 2014. 13(4):213.

15.Ebede TL, Arch EL, Berson D. Hormonal treatment of acne in women. J Clin Aesthet Dermatol; 2009.2(12):16.

16.Sathish V, Martin YN, Prakash YS. Sex steroid signaling: implications for lung diseases. Pharmacol Ther; 2015.150:94-108.

17.Dagur PK ,McCoy JP. Collection, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. Current protocols in cytometry / editorial board, J Paul Robinson, managing editor [et al]. 2015.73:5.1.-5.1.16.

18.Marks MA, Gravitt PE, Burk RD, Studentsov

Archive of SID

www.SID.ir

Y, Farzadegan H, Klein SL. Progesterone and 17β-estradiol enhance regulatory responses to human papillomavirus type 16 virus-like particles in peripheral blood mononuclear cells from healthy women. Clin Vaccine Immunol; 2010.17(4):609-17.

19.Karkhaneh A, Ansari M, Emamgholipour S, Rafiee MH. The effect of 17β-estradiol on gene expression of calcitonin gene-related peptide and some pro-inflammatory mediators in peripheral blood mononuclear cells from patients with pure menstrual migraine. Iran J Basic Med Sci; 2015.18(9):894.

20.Karpuzoglu E, Phillips RA, Gogal RM, Ahmed SA. IFN-γ-inducing transcription factor, T-bet is upregulated by estrogen in murine splenocytes: role of IL-27 but not IL-12. Molecul immunol; 2007.44(7):1808-14.

21.Hughes GC. Progesterone and autoimmune disease. Autoimmun Rev; 2012.11(6):A502-A14.

22.Khan D, Cowan C, Ahmed SA. Estrogen and signaling in the cells of immune system. Adv Neuroimmune Biol; 2012.3(1):73-93.

23.Wong C, Ho C, Ko F, Chan C, Ho A, Hui D, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-γ, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. J Clin Exp Immunol; 2001.125(2):177-83.

24.Lee YC. Synergistic effect of various regulatory factors in TH1/TH2 balance; immunotherapeutic approaches in asthma. Int J Biomed Sci; 2008.4(1):8.

25.Szekeres-Bartho J, Wegmann T. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1Th2 balance. Am J Reprod Immunol; 1996.31(1-2):81-95.

26.Kanda N, Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. Jacobs; 1999.103(2):282-8.

27.Shi Y, Shi G, Wan H, Jiang L, Ai X, Zhu H, et al .Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. Chin Med J; 2011.124(13):1951-6.

Archive of SID

www.SID.ir

Hormone replacement therapy: an effective approach in regulation of TH1-relatted responses in women suffering from allergic asthma

Leila Nejatbakhsh Samimi, Master of Immunology, Department of Immunology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Morteza Fallahpour, Assistant Professor of Immunology, Department of Clinical Allergy and Immunology, Rasool Akram Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Majid Khoshmirsafa, PhD Candidate of Immunology, Department of Immunology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Rasool Baharloo, PhD of Immunology, Department of Immunology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Paria Jorbozehdar, PhD Student of Immunology, Department of Immunology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Syed Ali Javad Mousavi, Professor, Air Pollution Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
***Reza Falak**, PhD, Associate Professor of Immunology, Immunology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). falak.r@iums.ac.ir

Abstract

Background: The pattern of incidence of asthma varies with age and sex, as females suffer more than males. Some asthmatic women report premenstrual exacerbation of asthma symptoms as well as variation of its severity during pregnancy, thus it is believed that sex hormonal changes could affect asthma. Hormone Replacement Therapy (HRT) is a routine and accepted procedure which is used for treatment of several cases such as irregular periods, hirsutism, menopausal manifestations, acne, osteoporosis and amelioration of the symptoms in some autoimmune disease. HRT could reduce the magnitude of variations in estrogen and progesterone over the menstrual cycle. According to increased asthma prevalence among women than men and regarding to expression of estrogen and progesterone receptor on lung and immune cells, we aimed to determine the effects of 17β-estradiol (E2) and progesterone (P4) alone and in combination form on expression of T-bet and IFN-ɣ cytokine secretion, in correlation with Th1 cell subset of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) (as crucial cells that could affect cytokines' balance) in asthmatic patients versus non-asthmatic healthy controls.

Methods: The diagnosis of asthma was confirmed on the basis of clinical symptoms and detection of allergen specific IgE. Then PBMCs were isolated and cultivated in 24-well plates in the presence or absence of 1% phytohemagglutinin (PHA), 10-8 M of estrogen and 10-6 M of progesterone, followed by mRNA isolation. After reverse transcription, real-time quantitative PCR was performed to evaluate the expression level of T-bet. We also measured the concentration of the related cytokine (IFN-ɣ) in supernatants by ELISA.

Results: The expression of T-bet as well as secretion of IFN-ɣ which is a Th1 related cytokine was significantly increased when a combination of both hormones were applied in case group compared to controls [Median: 84.04 (IQR: 77.32-177) and Median: 71.52 (IQR: 68.85-84.04) pg/ml respectively], however, treatment with these hormones alone did not show any significant effects.

Conclusion: We concluded that, treating PBMCs with estrogen and progesterone alone or in combination as an in vitro example of HRT, has stimulatory effect on Th1 cells' behavior that may have a role in improving (sometimes worsening because of the complex role of CD8+T cells) of allergic asthma symptoms. It is crucial to clarify the effect of these hormones on differentiated T helper cell population, which requires more studies to understand the effect of sex hormones on allergic asthma.

Keywords: Allergic asthma, Peripheral blood mononuclear cells, Estradiol, Progesterone, Hormone replacement therapy

Archive of SID

www.SID.ir